

การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสาร และ การนำโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

Development of DNA extraction method from a single rice seed and
utilization of molecular markers for rice varietal purity test

พยอม โคเบลลี¹⁾ วราพงษ์ ชมาฤกษ์¹⁾ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์¹⁾

พิกุล ลีลาฤกษ์¹⁾ กัลยา สานเสน¹⁾

Payorm Cobelli¹⁾ Varapong Chamarek¹⁾ Poonsak Mekwatanakarn¹⁾

Phikul Leelagud¹⁾ Kanlaya Sansen¹⁾

บทคัดย่อ

วิธีการตรวจสอบการปลอมปนพันธุ์ข้าวที่แม่นยำ คือการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย หรือ การจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาตรวจสอบความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมของข้าวแต่ละพันธุ์ การตรวจสอบหาความแตกต่างของข้าวแต่ละพันธุ์ หลังจากการสีข้าวแล้ว ข้าวสารที่ได้ไม่สามารถจะนำมาเพาะให้เป็นต้นเพื่อเก็บตัวอย่างไปมาสกัดดีเอ็นเอได้ เนื่องจากส่วนของต้นอ่อนถูกขัดสีออกไปแล้ว ดังนั้นการตรวจสอบการปลอมปนพันธุ์ในข้าวสาร จึงต้องทำการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดี่ยวๆ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากเนื่องจากเมล็ดข้าวสารมีองค์ประกอบหลักคือแป้งและมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารด้วยวิธีการที่ต่างกัน 3 วิธี ดังนี้ (1) วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย Proteinase K ใน SAD extraction buffer และ 2x CTAB (2) วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดดีเอ็นเออัตโนมัติชนิดเคลื่อนย้ายได้ (Maxwell) และ (3) วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดดีเอ็นเออัตโนมัติ (Xiril) ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารทั้ง 3 วิธีการ เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว สะดวก ประหยัด ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ มีปริมาณคงที่ และเพียงพอต่อการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอของข้าว และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวก็ให้ผลผลิตดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังได้สำรวจและทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จำนวน 32 โมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อจัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐานของข้าว จากการวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างตรงตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมาย จำนวน 23 โมเลกุลเครื่องหมาย ด้วยการใช้ cluster analysis สามารถจัดกลุ่มโมเลกุลเครื่องหมายได้เป็น 8 กลุ่ม ที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แสดงความ

1) ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตู้ ปณ. 65 อ. เมือง จ. อุบลราชธานี 34000 โทร: 045-344103-104 ต่อ 122

Ubon Ratchathani Rice Research Center, P.O. Box 65, Muang District, Ubon Ratchathani, 34000

Tel: 045-344103-104 Ext.122

แตกต่างกันตรงตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมาย จำนวน 13 โมเลกุลเครื่องหมาย ด้วยการวิเคราะห์ cluster analysis สามารถจัดกลุ่มโมเลกุลเครื่องหมายได้ 4 กลุ่ม ที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งโมเลกุลเครื่องหมายดังกล่าวแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 4-13 อัลลีล บนข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ทดสอบ จำนวน 27 พันธุ์/สายพันธุ์

คำสำคัญ: ข้าว การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว ลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ โมเลกุลเครื่องหมาย แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ข้าวสาร

คำนำ

ประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศผู้ผลิตข้าวได้เป็นอันดับ 6 ของโลก โดยมีจีน เป็นผู้ผลิตรายใหญ่ ที่สุด แต่ประเทศไทยสามารถส่งออกข้าวออกเป็นอันดับ 1 ของโลก และส่งออกในรูปข้าวสารคุณภาพสูง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะหลังๆ ข้าวจากประเทศไทยเริ่มไม่ได้รับความเชื่อถือในด้านคุณภาพ เนื่องจากการปลอมปนข้าวด้วยการผสมข้าวพันธุ์อื่นๆ โดยผู้ซื้อหรือผู้บริโภคไม่ทราบ ซึ่งเกิดขึ้นในตลาดทุกระดับทั้งข้าวเปลือกและข้าวสารทั้งในและต่างประเทศ การปลอมปนในบางกรณีก็ตรวจสอบได้ยาก เช่น กรณีของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นข้าวคุณภาพและราคาที่ดีกว่าถูกนำไปปนในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวคุณภาพสูงราคาดี เพื่อผลกำไรที่มากขึ้น ดังนั้นทางราชการจึงมีการควบคุมคุณภาพและตั้งมาตรการในการส่งออกขึ้น ซึ่งหนึ่งในหลายมาตรการก็คือการตรวจดีเอ็นเอข้าวหอม เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวและตรวจการปลอมปนของข้าวพันธุ์อื่น ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

การปะปนของพันธุ์ข้าวซึ่งทำให้เกิดความไม่บริสุทธิ์ในพันธุ์ยากแก่การจำแนกตามลักษณะทาง สันฐานวิทยา และคุณสมบัติทางเคมี หทัยรัตน์ และคณะ(2546) ได้ทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ ของ ข้าวพันธุ์รับรองจำนวน 76 พันธุ์โดยใช้ microsatellite หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) primers 29 คู่ ให้ alleles ที่ต่างกัน 257 แบบ และพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของข้าวพันธุ์รับรองได้ดี โดยพบ ภาพลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอของข้าวแต่ละพันธุ์รวม 29 loci และพบว่า primers ที่สามารถแยกความ แตกต่างของข้าวไทยได้มากที่สุดคือ RM149 รองลงมาคือ RM21, RM17, RM20, RM228, RM239, RM168, RM165, RM157 และ RM209 ตามลำดับ (DOA Birdo Homepage, 2550)

โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายแบบ co-dominant marker ปัจจุบันมี รายงานว่าโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ของข้าวมีอยู่ถึง 3,200 ตำแหน่งบนโครโมโซมข้าว (McCouch *et al.*, 2002) ดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จะถูกเพิ่มปริมาณ (amplification) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กที่เรียกว่า primers ซึ่งมีลำดับเบสคู่สม (complementary sequences) ที่สามารถจับคู่กับลำดับเบสที่ขนาบหัวท้ายตำแหน่ง

ของ SSRs เป็นตัวช่วยในการเริ่มต้นการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ต้องการ โมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้เทคนิค PCR นี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ใช้ตัวอย่างพืชและปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากได้ นอกจากนี้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมได้เป็นอย่างดี จึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ใช้จัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ ตลอดจนใช้สำหรับตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ

ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ข้าวด้วยลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจการปลอมปนของข้าวและใช้จำแนกพันธุ์ข้าวได้อย่างถูกต้อง ตลอดจนน่าจะใช้เป็นข้อมูลในการรองรับพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช ซึ่งการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ มีปัญหาหรือข้อจำกัดคือขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดี่ยวๆ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก เนื่องจากเมล็ดข้าวสารมีองค์ประกอบหลักคือแป้งและมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสาร เพื่องานตรวจสอบความบริสุทธิ์ของข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย (ลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ) ซึ่งจะต้องเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว สะดวก ประหยัด และเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวก็ควรจะให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นที่ต้องจัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และศึกษาวิธีการสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวสาร เพื่อให้ได้ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมและสามารถใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์หรือการปลอมปนของพันธุ์ข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสาร

1.1 การเตรียมตัวอย่างจากเมล็ดข้าวสาร

นำเมล็ดข้าวทั้งเมล็ดมาจำนวน 1 เมล็ด มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใส่ในหลอดพลาสติกก้นกว้าง ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติม extraction buffer ที่ผสม 0.008 mg/ml Proteinase K 400 μ l (พยอมและคณะ. 2550) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชม. (ข้ามคืน) หลังจากนั้นใส่ลูกเหล็กกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. ลงไปในหลอดพลาสติกเพื่อช่วยในการบด แล้วทำการบดเมล็ดข้าวสารให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (Mixer Mill MM 200/301: Retsch, Germany) ด้วยความเร็ว 30 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

1.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารด้วย Proteinase K ใน SAD extraction buffer และ 2x CTAB

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวสารที่บดได้ละเอียดแล้วมาเติม 2x CTAB solution (ดัดแปลงจาก Kang *et al.*, 1998) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ ประมาณ 5 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถึง 1-3 ชั่วโมง นำไปทำให้เย็นลงที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติมสาร Phenol, Chloroform และ Isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ ประมาณ 5 ครั้ง บั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำของเหลวชั้นบนในหลอดพลาสติก จำนวน 500 ไมโครลิตร ไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น (99.7-100 % v/v) ที่แช่เย็น จำนวน 350 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ ประมาณ 10 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำไปบั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ล้างดีเอ็นเอ ด้วย 70% เอธิลแอลกอฮอล์ จำนวน 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ประมาณ 1 นาที บั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งในอากาศประมาณ 15 นาที แล้วเติมสารละลาย 1X TE buffer จำนวน 30 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 2 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้วเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส (Fig. 1)

1.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิดเคลื่อนย้ายได้

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวสารที่บดได้ละเอียดมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการสกัดของ Maxwell^R 16 DNA Purification Kits (Promega) ซึ่งเป็นการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ระบบอนุภาคแม่เหล็กในการดูดจับดีเอ็นเอไว้ ทำให้ป้องกันการอุดตันของเศษพืชในไมโครไปเปต หรือการปนเปื้อนจากเคมีที่ใช้ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอในระหว่างการดูดย้ายสารละลายดีเอ็นเอผลทำให้ระดับความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้สูงกว่าวิธีการสกัดแบบอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่ได้ใช้สารเคมีที่เป็นสารก่อมะเร็ง คือฟีนอลและคลอโรฟอร์มในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ปลอดภัยต่อผู้ทำงานทดลองและไม่เป็นพิษสิ่งแวดล้อม โดยสกัดดีเอ็นเอในเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิดเคลื่อนย้ายได้ (Maxwell^R 16 Instrument, USA) (Fig. 2)

1.4 การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวสารที่บดได้ละเอียดมาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการสกัดของ Wizard^R Magnetic 96 DNA Plant System (Promega) ซึ่งเป็นการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ระบบอนุภาคแม่เหล็ก ซึ่งเป็นระบบที่ไม่เหมือนระบบที่ใช้คอลัมน์ (column-based systems) เนื่องจากการจับของดีเอ็นเอบนผงหรืออนุภาค

แม่เหล็ก (magnetic particles) จะมีประสิทธิภาพมากกว่า และในขั้นตอนการล้างดีเอ็นเอในการทำให้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ จะสามารถทำได้อย่างสะอาดและสมบูรณ์ ส่วนขั้นตอนการนำดีเอ็นเอออกจากผงแม่เหล็กก็ทำได้ง่าย ลดการปนเปื้อนจากสารเคมีที่ไม่ต้องการ จากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอ และขั้นตอนการล้างทำความสะอาดดีเอ็นเอ ผลทำให้ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเพิ่มสูงขึ้น โดยสกัดดีเอ็นเอในเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (Xiril, Switzerland) ที่ควบคุมระบบสั่งการโดยคอมพิวเตอร์ (Fig. 3)

1.5 การตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงดึงดูดผิว (Nanodrop spectrophotometer: Nanodrop ND-1000, USA)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดข้าว จากทั้ง 3 วิธีการ มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงดึงดูดผิว โดยใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง/ครั้ง โดยทำการวัดที่ค่าการดูดซับแสง (Absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้คือ นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดซับแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง ควรมีค่าเท่ากับ 1.8 ($A260/A280 = 1.8$) หากค่าสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน ฟีนอล หรือสารเคมีอื่นๆ

1 การจัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (allele standard) เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

2.1 โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs และพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวที่ใช้จัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

คัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ที่ทราบตำแหน่งบนทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว เพื่อให้มีการกระจายตัวทั้งจีโนมข้าว จำนวน 32 โมเลกุลเครื่องหมาย (Table 1) มาทดสอบความสามารถในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์/สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 27 พันธุ์/สายพันธุ์ (Table 2)

2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งเท่าเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 10-20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งองค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่จะประกอบด้วย Taq master mix 5 ไมโครลิตร, ddH₂O 2.5 ไมโครลิตร, Primer F (10 พิกกะโมล/ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร, Primer R (10 พิกกะโมล/ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร, DNA template 2 ไมโครลิตร สำหรับปริมาตรองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเครื่องพีซีอาร์ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (1) ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำ

ให้ดีเอ็นเอต้นแบบหรือ template ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double strand) แยกตัวออกจากกันเป็นสายเดี่ยว (Single strand) โดยการใช้อุณหภูมิสูง 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (2) ขั้นตอน Primer annealing หรือ annealing ใช้อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นขั้นตอนที่ปล่อยให้มีการจับกันระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกได้ จากขั้นตอนแรกกับสายไพรเมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้นๆ การจับกันนี้จะเป็นการจับกันตรงบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (complementary base) ซึ่งเกิดขึ้นได้เมื่ออุณหภูมิของดีเอ็นเอลดลงจากขั้นตอนแรก (3) ขั้นตอน Primer extension หรือ extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นขั้นตอนที่มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมา โดยอาศัยดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออกจากกันทั้งสองสายเป็นแม่พิมพ์ทั้งนี้อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และ dNTPs แล้วปล่อยให้เครื่องพีซีอาร์ทำซ้ำขั้นตอนที่กล่าวข้างต้นจนครบ 35 รอบ ก็จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นเป็นล้านๆ เท่า

2.3 การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

แยกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ ด้วยสนามไฟฟ้าที่เคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก (Electrophoresis) ผ่านวุ้น (polyacrylamide gel) ความเข้มข้น 6% ในสารละลาย 1% TBE buffer โดยนำผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกใช้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 6x Loading formamide dye buffer ที่ใช้บอกระยะทาง จำนวน 4 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (DNA denaturation) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94-95 °C นาน 3 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นำผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกใช้ดังกล่าว จำนวน 3 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดบวุ้น เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอจนหมด ให้ใส่ดีเอ็นเอความเข้มข้นมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Biolabs) (0.5 µg/µl) ปริมาณ 3 µl /หลอด ลงไปในหลอดแรก และหลอดสุดท้าย เพื่อใช้บอกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ แล้วนำไปให้กระแสไฟฟ้า 1,200 โวลต์ (80-100 วัตต์) วิ่งผ่านเป็นเวลาประมาณ 1-1.30 ชั่วโมง หรือให้สีที่ใช้บอกระยะทางเคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 15-18 เซนติเมตร จึงนำไปย้อมสีด้วย 0.1% ซิลเวอร์ไนเตรท (Silver staining) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 5 วินาที นำมาใส่ในสารละลาย developer ประมาณ 5 นาที หรือ จนเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏบนกระจกจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 % acetic acid จากนั้นนำกระจกไปผึ่งให้แห้ง ก่อนทำการบันทึกภาพ และหลังจากนั้นนำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 27 พันธุ์/สายพันธุ์ที่จัดทำขึ้นด้วยโมเลกุลเครื่องหมายมาดำเนินการให้ค่าคะแนนเป็น binary data โดยหากพันธุ์/สายพันธุ์ข้าว มีแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับขนาดแถบดีเอ็นเอในพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะให้ค่าคะแนนเป็น 1 ส่วนในพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง จะให้ค่าคะแนนเป็น 0 แล้ววิเคราะห์ข้อมูลด้วยการใช้ Cluster analysis (NTSYSpc version 2.10)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสาร

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดี่ยวๆ โดยการนำเมล็ดข้าวดังกล่าว มาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน) ในสารละลาย Extraction buffer ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับ 8 ที่มีการเติม Proteinase K (0.008 mg/ml) และ 0.5% SDS ก่อนทำการบดเมล็ดข้าวให้ละเอียด ด้วยเครื่องบดตัวอย่าง แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 3 วิธีการ ดังนี้ (1) วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารด้วย 2X CTAB (2) วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิดเคลื่อนย้ายได้ (Maxwell) และ (3) วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (Xiril) เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธีนี้มาทำการตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว พบว่าได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณะดีเอ็นเอข้าว อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมชนิดเคลื่อนย้ายได้ เป็นวิธีการที่ทำได้รวดเร็วที่สุด คือสามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเมล็ดข้าวสาร 96 ตัวอย่างภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง ส่วนวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ใช้เวลา 9 ชั่วโมง/96 ตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วย 2X CTAB ใช้เวลา 3 วัน/96 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายในการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ จะมีราคาถูกที่สุด คือ 200 บาท/ตัวอย่าง ในขณะที่การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมชนิดเคลื่อนย้ายได้ ราคา 350 บาท/ตัวอย่าง และการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวด้วย 2X CTAB ราคา 300 บาท/ตัวอย่าง (Fig. 4) ปริมาณผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธีการ พบแตกต่างกันเล็กน้อย คือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย 2X CTAB ได้ปริมาณ 20-30 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 83-166 นาโนกรัม/ไมโครลิตร การสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติชนิดเคลื่อนย้ายได้ (Maxwell) ได้ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 80-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และและการสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (Xiril) ได้ปริมาณ 60 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 20-50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ไม่แตกต่าง คืออยู่ในช่วงระหว่าง 1.8-2.00 ซึ่งแสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธีการ มีความบริสุทธิ์สูง

2. การจัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (allele standard) เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

ผลการจัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย จำนวน 32 โมเลกุลเครื่องหมาย บนข้าวจำนวน 27 พันธุ์/สายพันธุ์ พบโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวข้าวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ข้าวชัยนาท 1 จำนวนทั้งสิ้น 23 โมเลกุลเครื่องหมาย และสามารถแยก

ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 จำนวนทั้งสิ้น 13 โมเลกุลเครื่องหมาย ซึ่งพบว่าแต่ละโมเลกุลเครื่องหมายแสดงความหลากหลายของรูปแบบข้อมูลทางพันธุกรรมหรือแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดที่แตกต่าง (อัลลีล) ตั้งแต่ 4 ถึง 13 อัลลีล (Fig. 5-7) และจากการวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วยการใช้ cluster analysis พบว่าสามารถจัดกลุ่มโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จำนวน 23 โมเลกุลเครื่องหมาย ออกเป็น 8 กลุ่ม ที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (Fig. 8) และสามารถจัดกลุ่มโมเลกุลเครื่องหมายจำนวน 13 โมเลกุลเครื่องหมาย ได้เป็น 4 กลุ่ม ที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (Fig. 9) ซึ่งหากนำโมเลกุลเครื่องหมายดังกล่าวมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว โดยเฉพาะการตรวจสอบพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ถูกปลอมปนด้วยพันธุ์ข้าวชัยนาท 1 สามารถที่จะนำโมเลกุลเครื่องหมายเพียง 8 โมเลกุลเครื่องหมายมาใช้ในการตรวจสอบแทนที่จะนำมาใช้ทั้ง 23 โมเลกุลเครื่องหมาย ส่วนการตรวจการปลอมปนในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ใช้โมเลกุลเครื่องหมายเพียง 4 โมเลกุลเครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างของข้าวทั้งสองพันธุ์ได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ทั้ง 13 โมเลกุลเครื่องหมาย ดังนั้นการจัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน จึงมีความสำคัญในแง่การคัดเลือกตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้ เพื่อการตรวจสอบการปลอมปนในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดเวลา ค่าสารเคมี ค่าแรง และเป็นมาตรฐานเดียวกันในทุกห้องปฏิบัติการ

อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวต่อไป เพื่อให้ได้โมเลกุลเครื่องหมายชนิดต่างๆ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวต่างๆ ได้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs หรือ STSs (Sequence Tag Sites) โดยเฉพาะโมเลกุลเครื่องหมายชนิด STSs ที่ถือว่าเป็นโมเลกุลเครื่องหมายแบบสมบูรณ์ ที่เหมาะจะนำมาใช้ในในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก และ ประหยัด ส่วนการศึกษาวิธีการสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวสาร เพื่อให้ได้ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมและสามารถใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบได้ดี คือมีขนาดตัวอย่างที่ไม่น้อยเกินไปจนไม่สามารถตรวจพบการปลอมปนได้ และหรือมีขนาดใหญ่เกินไปจนทำให้เสียเวลา และเสียค่าใช้จ่ายมากในการตรวจสอบ อยู่ในระหว่างดำเนินการ ซึ่งคาดว่าจะได้วิธีการสุ่มตัวอย่างที่มีแม่นยำ และได้มาตรฐานสำหรับตรวจสอบการปลอมปนในพันธุ์ข้าวปลายปี 2552 นี้

สรุปผลการทดลอง

ผลการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดียว จากทั้งวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย

(1) Proteinase K ใน SDS extraction buffer และ 2X CTAB (2) การสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดสาร

พันธุ์กรรมอัตโนมัติชนิดเคลื่อนย้ายได้ (Maxwell) และ (3) การสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องสกัดสารพันธุ์กรรมอัตโนมัติ (Xiril) ทำให้ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอข้าว อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวก็ให้ผลผลิตดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ส่วนผลการจัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้อ้างอิงในการตรวจสอบความบริสุทธิ์และความแปรปรวนในข้าวพันธุ์ต่างๆ ของไทย โดยเฉพาะในกลุ่มข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 พบโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จำนวน 23 โมเลกุลเครื่องหมาย โดยการจัดกลุ่มได้ 8 กลุ่ม และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์ชยันนาท 1 นอกจากนี้ยังพบโมเลกุลเครื่องหมาย จำนวน 13 โมเลกุลเครื่องหมาย โดยจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งโมเลกุลเครื่องหมายดังกล่าวแสดงความหลากหลายของรูปแบบข้อมูลทางพันธุ์กรรม หรือขนาดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (อัลลีล) จำนวน 4-13 อัลลีล

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ธีรดา หวังสมบุญรัตน์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยอ่านต้นฉบับ ให้ข้อคิดเห็น พร้อมคำแนะนำ ทำให้รายงานการวิจัยฉบับนี้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์ข้าว ปี 2547-2551. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 64 หน้า.
- พยอม โคเบल्ली, วราพงษ์ ชมาฤกษ์ และ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2550. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย (Rice Varietal Purity Test by Using Molecular Marker). วารสารวิชาการข้าว. 1: 44-51.
- หทัยรัตน์ อุไรวงศ์, ญัฐหทัย เอพาณิข และเสริมพร กิ่งพุทธพงศ์. 2546. การวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวไทย (DNA Fingerprint of Thai Rice Varieties). ผลงานวิจัยสำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2 หน้า.
- DOA Birdo Homepage. (2550). ผลงานวิจัยสำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Database. วันที่ค้นข้อมูล 19 มีนาคม 2550, จาก <http://www.doa.go.th/birdo/result47/hatairat.htm>
- Chen D.H., and P.C. Ronald. 1999. A rapid DNA miniprep method suitable for AFLP and others PCR applications, Plant Mol. Bio. Rep. 17: 53-57.

- Kang H.W, Y.G. Cho, U.H. Yoon and M.U. Eun. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. *Plant Mol Biol* 16: 1-9.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Malton, B. Fu, R. Maghirang, Y. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*. 9:199-207.
- Wanchana S, T. Toojinda, S. Tragoonrung and A. Vanavichit. 2003. Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Science* 165: 1193-1199.
- Wanchana S, W. Kamolsukyonyoung, S. Ruengphayak, S. Tragoonrung, T. Toojinda and A Vanavichit. 2005. A rapid Construction of a Physical Contig across a 4.5 cM Region for Rice Grain Aroma Facilitates Marker Enrichment for Positional Cloning. *Sci. Asia* 31: 299-306.

Table1 SSR markers used for allele standard.

No.	Maker designation	Chromosome no.
1	RM149	8
2	RM21	11
3	RM17	12
4	RM20A	12
5	RM20B	11
6	RM228	10
7	RM239	10
8	RM165	1
9	RM157A	3
10	RM209	11
11	RM231	3
12	RM225	6
13	RM261	4
14	RM258	10
15	RM201	9
16	RM3	6
17	RM248	7
18	RM257	9
19	BO3	8
20	GT11	6
21	RM190	6
22	RM204	6
23	RM3627	1
24	Glu-23F/R	6
25	RM1	1
26	RM202	11
27	RM206	11
28	RM217	6
29	RM220	1
30	RM224	11
31	RM232	3
32	RM235	12

RM = Rice Microsatellite

Table 2. List of rice lines/varieties used for allele standard

No.	Lines/Varieties	Source
1	CT9993-1-10-M (CT99)	IRRI
2	IR36 (IR36)	IRRI
3	IR64 (IR64)	IRRI
4	Azucena (Azu)	IRRI
5	Lemont (Lem)	IRRI
6	Nipponbare (Nipb)	IRRI
7	ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)	Ubon Rice Research Center
8	กข33 (RD33)	Ubon Rice Research Center
9	IR77954-27-39 (IR39)	Ubon Rice Research Center
10	ปทุมธานี 1 (PTT1)	Ubon Rice Research Center
11	กข6 (RD6)	Ubon Rice Research Center
12	ชัยนาท 1 (CNT1)	Ubon Rice Research Center
13	กข15 (RD15)	Ubon Rice Research Center
14	เหนียวอุบล 2 (NUBN2)	Ubon Rice Research Center
15	หอมพิษณุโลก 1 (HPSL1)	Phitsanulok Rice Research Center
16	พิษณุโลก 2 (PSL2)	Phitsanulok Rice Research Center
17	พิษณุโลก 3 (PSL3)	Phitsanulok Rice Research Center
18	ข้าวเหนียวสันป่าตอง (NSGB)	National Rice Germplasm Bank
19	เจ้าฮ่อ (JHGB)	National Rice Germplasm Bank
20	แจ้เขยกาบเขียว (JKGB)	National Rice Germplasm Bank
21	ข้าวเหนียวดำ (KNDGB)	National Rice Germplasm Bank
22	สังข์หยดพัทลุง (SYGB)	National Rice Germplasm Bank
23	ข้าวขาวกอเดียว (KKDGB)	National Rice Germplasm Bank
24	ปิ่นแก้ว 56 (PK56GS)	National Rice Germplasm Bank
25	ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105GB)	National Rice Germplasm Bank
26	กข6 (RD6GB)	National Rice Germplasm Bank
27	ขาวตาแห้ง 17 (KTH17GB)	National Rice Germplasm Bank

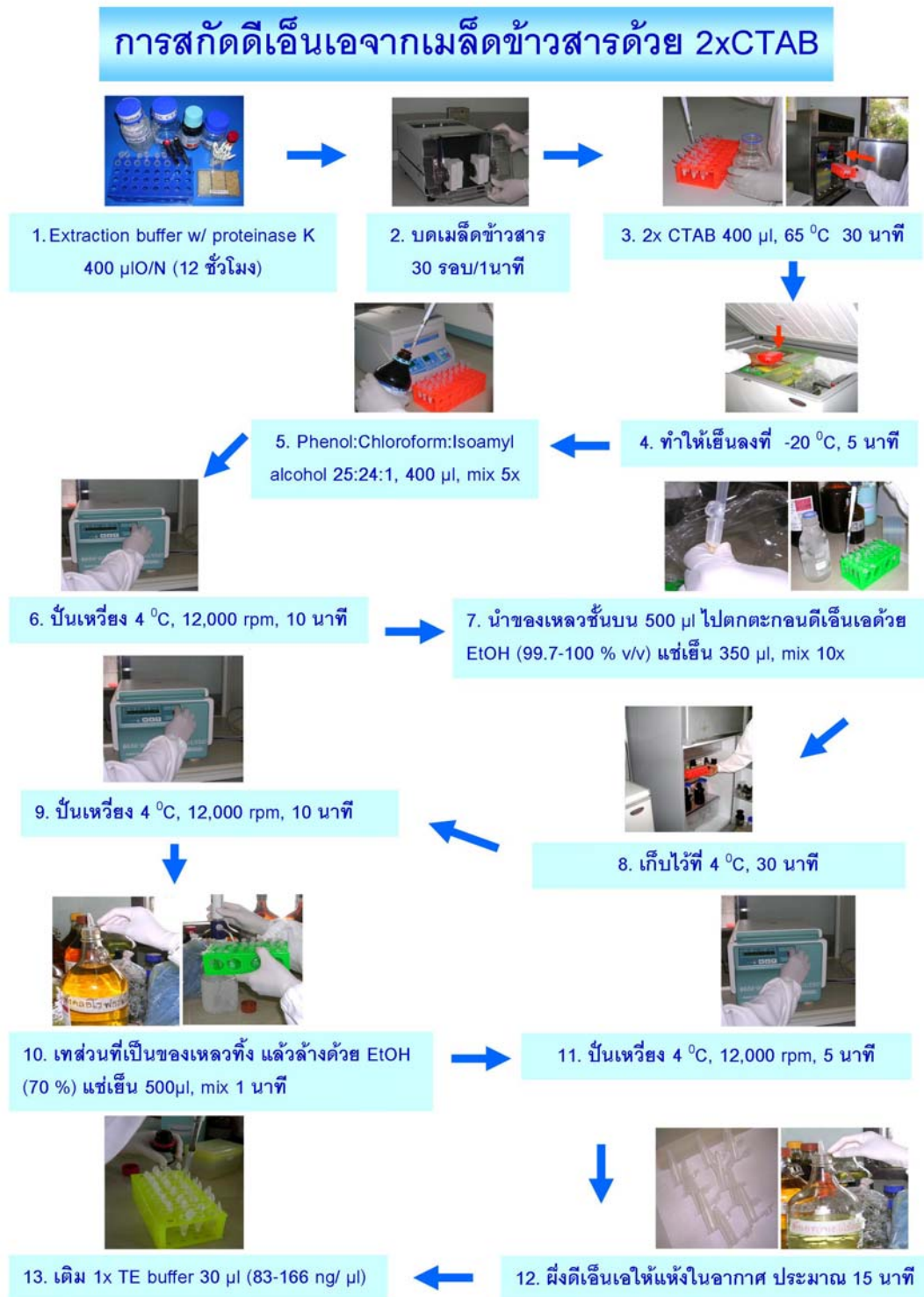


Fig. 1 Proteinase K in SDA extraction buffer and 2X CTAB DNA extraction method from a single milled rice seed.

การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมชนิดโมบาย
Maxwell 16 Instrument และ Maxwell^R 16 DNA Purification Kits (Promega)

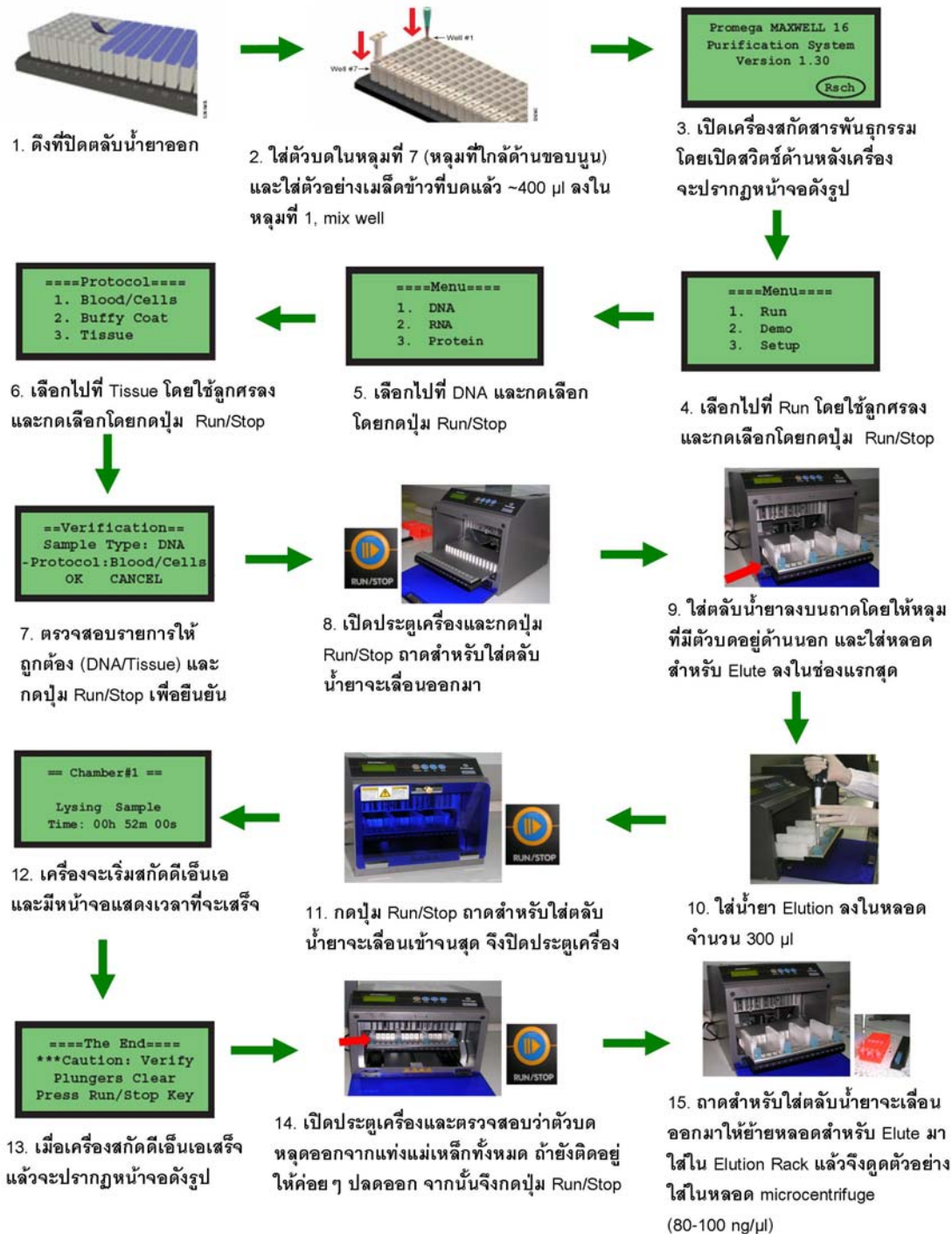


Fig. 2 DNA extraction method from a single milled rice seed by mobile automated DNA extractor (Maxwell)

การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ
Xiril และ Wizard[®] Magnetic 96 DNA Plant System (Promega)

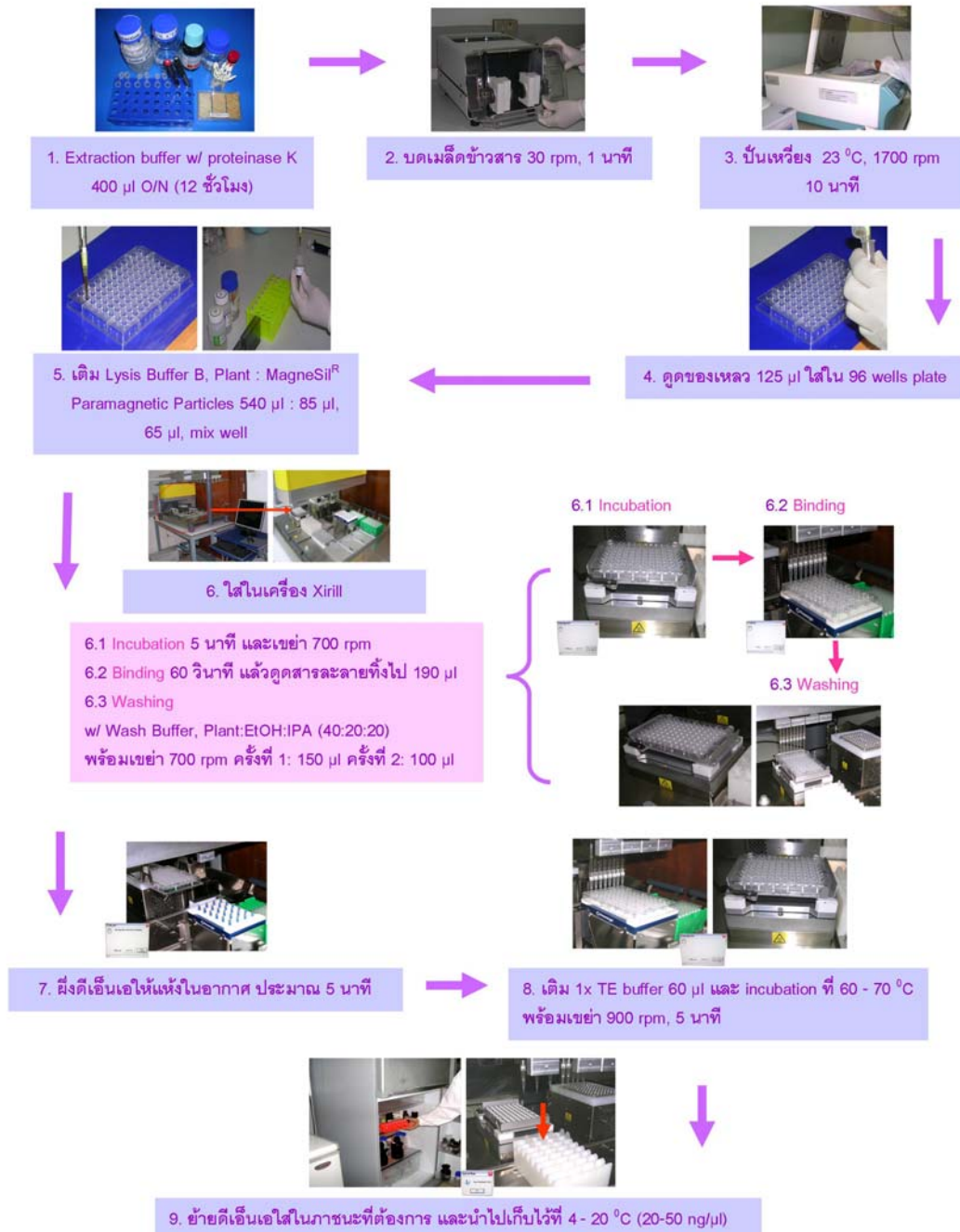


Fig. 3. DNA extraction method from a single milled rice seed by automated DNA extractor (Xiril)

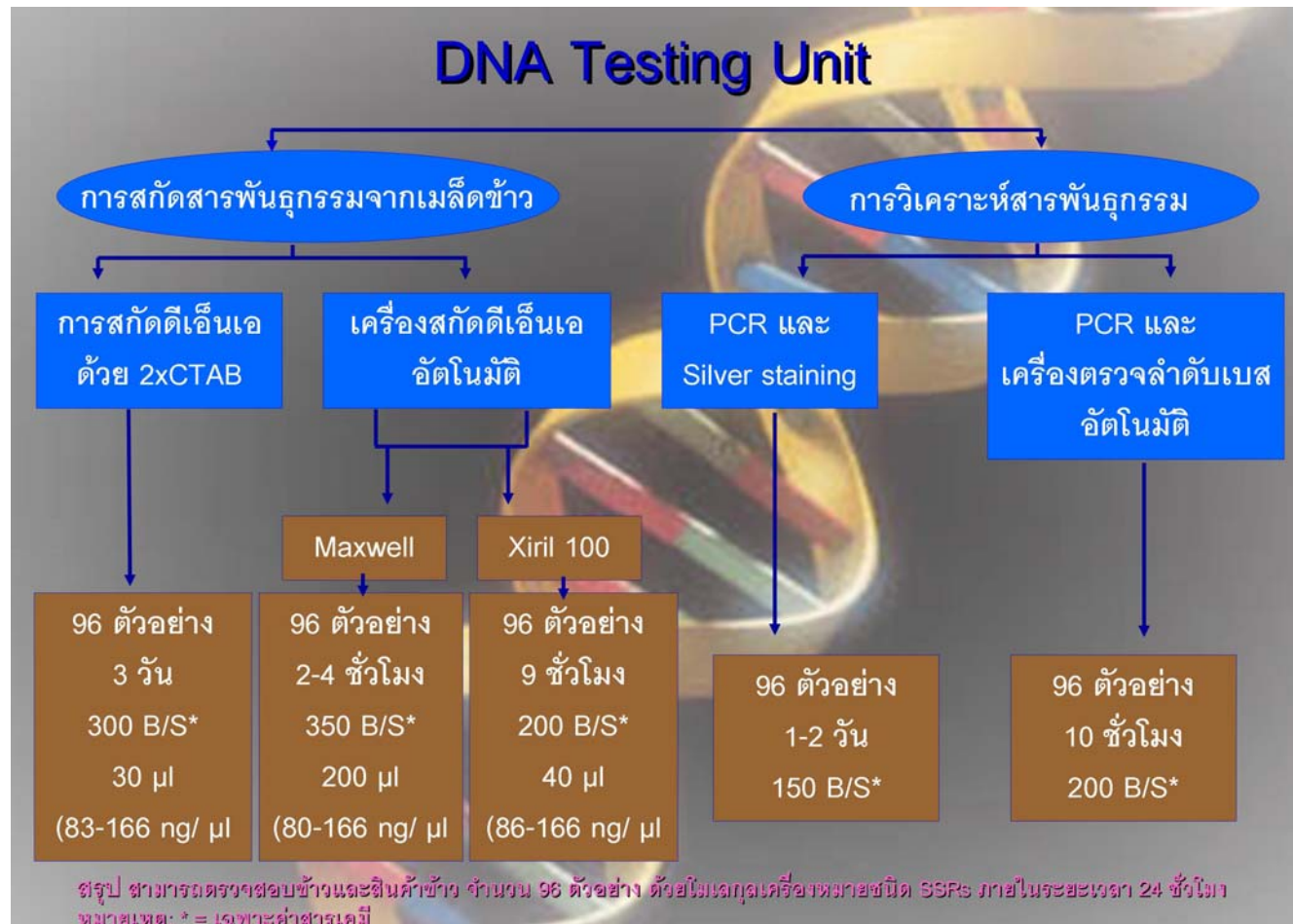
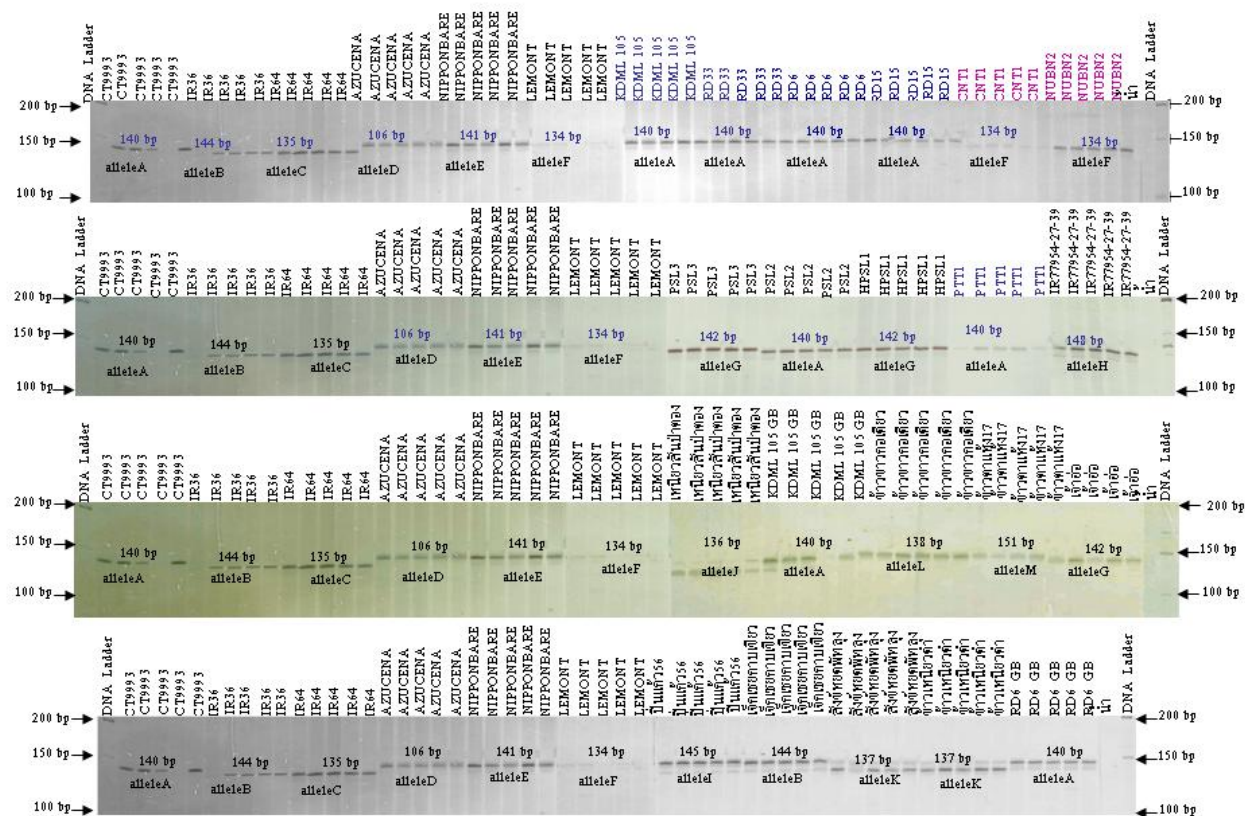


Fig. 4. Comparison of cost and time among three difference DNA extraction method from a single milled rice seed



B03 13 allele: A= 140 bp (KDM105, RD6, RD33, RD15, PTT1)

: F= 134 bp (CNT1, NUBN2)

Fig. 6. DNA fingerprinting of 27 rice lines/varieties amplified with B03 primer showed 13 different size of DNA fragments (alleles).

A 100 bp DNA ladder (Biolabs) was used as a size standard.

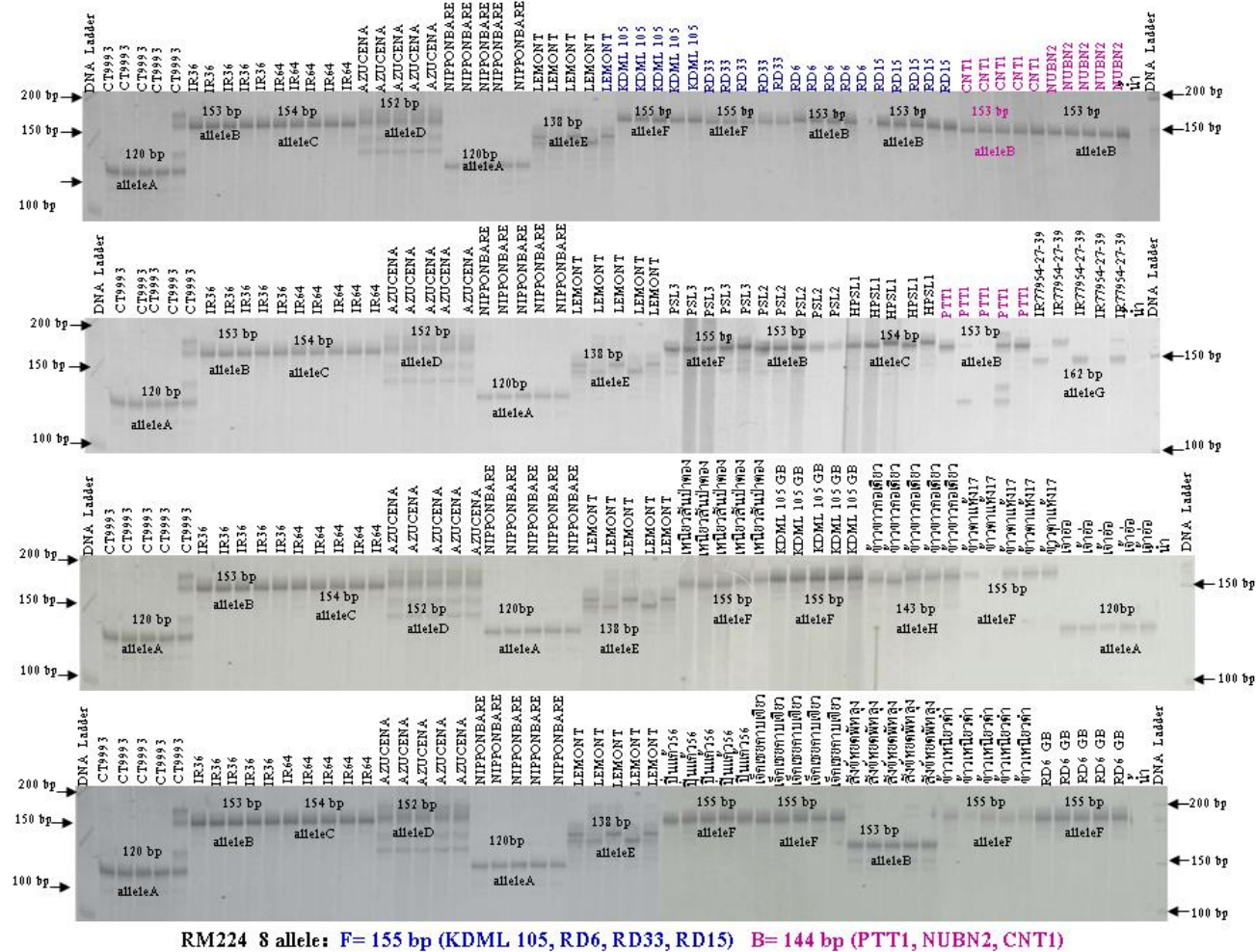


Fig. 7. DNA fingerprinting of 27 rice lines/varieties amplified with RM224 primer showed 8 different size of DNA fragments (alleles).

A 100 bp DNA ladder (Biolabs) was used as a size standard.

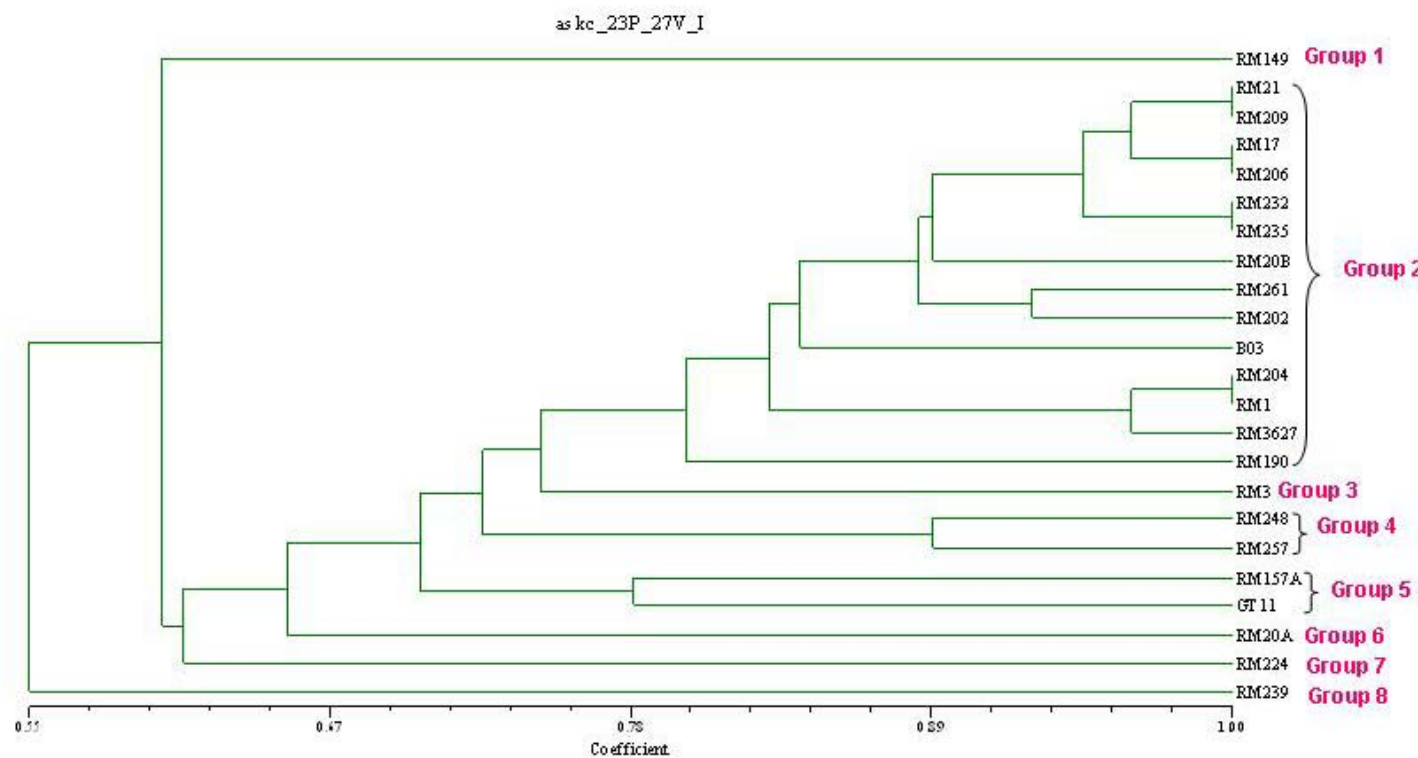


Fig. 8. Dendrogram obtained by cluster analysis of DNA fingerprinting of 23 SSRs makers. The 8 groups of SSR markers formed at 75% similarity level is given in bold.

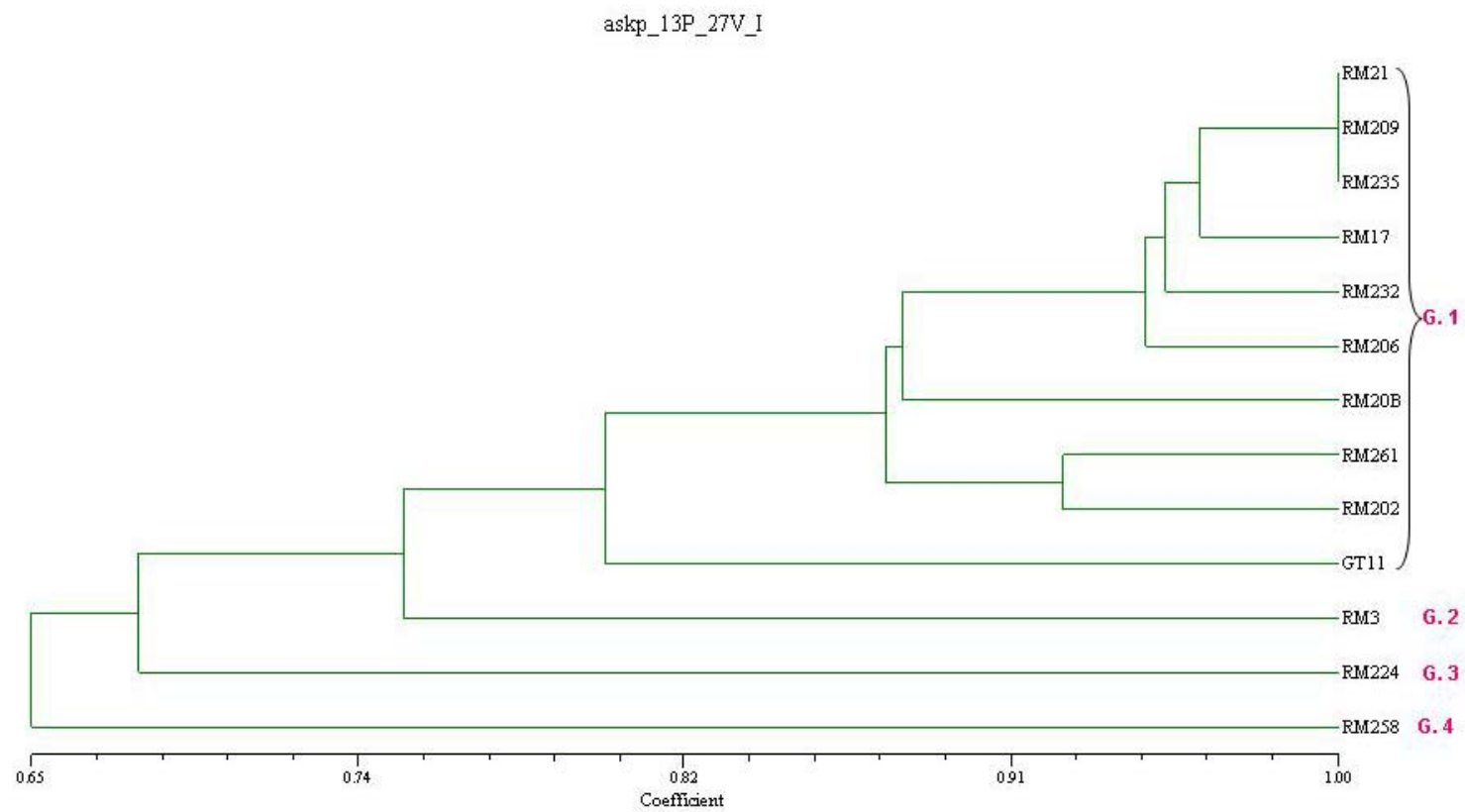


Fig. 9. Dendrogram obtained by cluster analysis of DNA fingerprinting of 13 SSRs makers. The 4 groups of SSR markers formed at 75% similarity level is given in bold.